动 物 学 研 究 2006，Oct. 27 (5)：549 – 557 CN 53 – 1040/Q ISSN 0254 – 5853
Zoological Research

# 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能

姚翠鸾[1]，王志勇[1,*]，相建海[2]
（1. 集美大学 水产学院，福建 厦门 361021；2. 中国科学院海洋研究所，山东 青岛 266071）

**摘要：**甲壳动物的免疫反应主要依靠吞噬、包囊和凝集，属于非特异性免疫。血细胞在甲壳动物的免疫系统中具有重要作用。造血组织和造血干细胞为血细胞的生成、补充和更新提供了保障。血细胞成熟后分为不同类型，对血细胞分型的研究正在从采用传统的形态学方法向采用生物技术方法的方向发展，单克隆抗体技术已经应用于血细胞分型，结果更为客观准确。不同类型的血细胞在细胞化学特性与功能方面表现出明显差异。在甲壳动物的免疫反应中，血细胞数量在不同的免疫应激状态下发生明显变化。当外来病原体较小时，血细胞通过吞噬作用吞入病原体，在细胞内部将病原杀灭；而当入侵的病原体或寄生虫的个体大于 10 μm 时则以多个血细胞的包囊作用或凝集作用来完成。甲壳动物的免疫反应是一个交互作用的复杂过程，必然涉及多层次、多个因子的参与。其中造血组织的结构，血细胞的产生及调控机理，采用单克隆抗体技术对血细胞进行分型标准的建立，免疫因子在免疫反应中的功能及它们之间的相互作用的网络关系等尚需深入研究。

**关键词：**甲壳动物；血细胞；造血组织；造血干细胞；免疫反应
**中图分类号：**Q959.223.02 **文献标识码：**A **文章编号：**0254 – 5853 (2006) 05 – 0549 – 09

# Crustacean Haemocytes and Their Function in Immune Responses

YAO Cui-luan[1], WANG Zhi-yong[1,*], XIANG Jian-hai[2]
(1. *Fisheries College, Jimei University, Xiamen* 361021, *China*;
2. *Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao* 266071, *China*)

**Abstract:** Crustaceans have been shown to possess a primitive immune system that relies mainly on phagocytosis, encapsulation and agglutination. Haemocytes play important roles in crustacean immune responses. It is generally agreed that haematopoietic tissue (HPT) and haematopoietic stem cells are responsible for the production and supply of haemocytes. Most crustacean mature haemocytes were classified into three types by using light microscopy in the past few years. Recently, the monoclonal antibody technique has been used in identifying the types of some crustacean haemocytes, which was proved to be more accurate than classical methods. The cytochemical characteristics and function of different haemocyte subpopulations show significantly difference, suggesting a role for these cells in particular functions. It is demonstrated that total haemocyte counts (THC) changed obviously in crustacean immune response. Generally, the haemocytes defense action in crustaceans relies mainly on phagocytosis when the pathogen is very small, and the microorganism was killed in haemocytes. When a microorganism or parasite is bigger than 10 μm, encapsulation and agglutination played a more important role. Moreover, the immune response of crustacean is very complex, during which cell co-operation and communication, and immune factors interaction are necessary. The study on the structure of HPT and the production mechanism of haemocytes, the establishment of classification standard of haemocyte subpopulations, the function and interaction of immune factors should be the main focus in the future.

**Key words:** Crustacean; Haemocyte; Haematopoietic tissue; Hematopoietic stem cells; Immune response

收稿日期：2006 – 02 – 13；接受日期：2006 – 05 – 26
基金项目：国家自然科学基金资助项目 (30140017；30671605)；集美大学中青年创新团队专项基金 (2006A001)；福建省科技重大资助项目 (99-Z-7)
* 通讯作者 (Corresponding author)，E-mail：zywang@jmu.edu.cn
第一作者简介：姚翠鸾 (1971 – )，女，博士，副教授，主要从事甲壳动物免疫学研究。

甲壳动物是节肢动物门内形态结构、栖息环境差异多样性最高的动物类群（Liu，2003）。由于该类群在海淡水域的优势地位、巨大产量和在渔业生产中的重要价值，因而在水产养殖业中占有重要地位。近年来，随着经济甲壳动物养殖规模的不断扩大，其病害发生日益频繁。免疫防御体系是甲壳动物抗病力的基础，但其免疫反应要比高等动物简单得多。甲壳动物免疫系统属非特异免疫系统，缺乏免疫球蛋白，主要靠物理屏障、吞噬、包囊、凝集及结节形成等途径来防御及清除病原和外来异物。血细胞在其免疫反应中起着重要作用，机体的免疫保护作用主要是由血细胞来承担的。血细胞随着血液循环分布到身体各处，在宿主的免疫反应中起着识别、吞噬、黑色素形成、细胞毒性和细胞通讯的作用，发挥着吞噬、结节、包囊等免疫防御功能（Söderhäll & Cerenius，1992）。造血组织和造血干细胞为血细胞的生成、补充及更新提供了保障（Mats & Pia，2000）。

## 1 血细胞的产生

### 1.1 造血组织

成熟的血细胞不能进行有丝分裂。其更新补充是由造血组织来完成的（Mats & Pia，2000）。在甲壳动物中，片状的造血组织主要位于胃的背部，由结缔组织包围。一般认为造血干细胞存在于造血组织内（Mats & Pia，2000）。

Chaga et al（1995）对螯虾（*Pacifastacus leniusculus*）的造血组织内细胞形态研究后，发现不同形态的造血细胞排列在一起，并且密集地堆积在造血组织的小叶中或小叶间。造血组织内分布有大约五种类型的血细胞：第一类细胞在小叶顶端，外观未分化，可以观察到有丝分裂，基本无颗粒，紧靠其他细胞或胞外基质（extra cell matrix，ECM），很难将它们从组织中释放出来；第二至第四类细胞更靠近外侧，具有颗粒，可能代表颗粒细胞的不同发育阶段；第五类细胞具有颗粒，形态上不同于其他细胞，可能代表另外一种分支。但是这五类细胞之间的关系还不清楚。其他甲壳动物，如三叶真蟹（*Carcinus maenas*）、龙虾（*Homarus americanus*）中造血组织和造血细胞都类似这种情况（Ghiretti-Magaldi et al，1977；Martin et al，1993）。

对虾则有所不同，Hose et al（1992）认为锐脊单肢虾（*Sicyonia ingentis*）的造血作用发生在由大量网状维管组成的一对造血窦。斑节对虾（*Penaeus monodon*）造血组织的研究表明：造血组织分布在头胸部的不同位置，主要集中在胃的背部与颚足基部，少量分布在接近触角腺的部位（Van de Braak et al，2002b）。幼虾在受到实验刺激后，造血组织明显扩大并且可见小叶贯穿整个头胸部（Van de Braak et al，2002b）。电镜观察发现，造血组织中存在四种类型的血细胞，第一类可能是大颗粒和小颗粒细胞的前体，逐渐成熟并分别向第二类和第三类细胞分化，这些前体细胞位于小叶的外部，成熟的血细胞移动到小叶内侧，可以直接释放到血腔中；第四类细胞表现出间质细胞的典型特征（Van de Braak et al，2002b）。Zhan et al（2002）采用单克隆抗体技术研究表明，中国明对虾（*Fenneropenaeus chinensis*）仔虾造血组织分散在胃、肝胰腺、心脏、附肢基部等部位；在第二触角中心处有管状的造血组织存在。

对虾在感染白斑杆状病毒（white spot syndrome virus，WSSV）后，造血组织也会发生一些变化。采用透射电镜对感染 WSSV 的对虾进行研究，在对虾的造血组织中可以观察到 WSSV，提示 WSSV 可以感染对虾造血组织中未成熟的血细胞（Jiravanichpaisal et al，2006）。

Hernroth et al（2004）报道，水体中丰富的金属离子 Mn 不能引起螯虾造血组织的增生。Vogt et al（1994）的研究发现，每日在幼虾饵料中添加 1 mg/L 的 Cu 离子，连续饲喂 10 天后，发现 Cu 离子在造血组织等组织中沉积，提示不同金属离子对对虾的造血组织的影响不同。

### 1.2 造血干细胞

造血干细胞在血细胞的生成过程中起着重要作用。Söderhäll et al（2003）建立了一种从螯虾体内分离造血干细胞的方法，并研究了血细胞生成作用。发现造血组织具有活跃的血细胞增殖能力。在造血干细胞中发现了细胞粘连因子（peroxinectin）的转录，并发现了在果蝇和哺乳动物体内已知参与造血功能的 Runt-domain protein 基因在血细胞释放前是上调的，但是没有检测到酚氧化酶的 mRNA，说明血细胞的合成和部分分型是在造血组织内完成的，造血组织内的造血干细胞在功能上不同于成熟的血细胞。

## 2　血细胞类型及功能

### 2.1　血细胞的形态和分类

目前研究得较多的虾蟹类甲壳动物的血细胞多具有透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞三类( Alikhan & Naich,1987;Benjamin & James,1987;Ferreo et al,1989;Barracco & Ameirante,1992;Zhou et al,2001;Zhu et al,2002 )。而 Lu（2002）采用电镜技术研究了中华绒螯蟹（*Eriocheor sisensis*）的血细胞类型，结果表明，除了上述 3 种类型的血细胞外，中华绒螯蟹还具有一种介于大颗粒和小颗粒细胞之间的中间型颗粒细胞。Ravindranath（1974）研究还发现，等足目 *Ligia exotica* 具有 9 种不同类型的血细胞。Martin et al（1999）采用显微镜技术和细胞化学手段对卤虫（*Artemia salina*）的血细胞进行研究后发现，卤虫只含有一种圆盘状的血细胞，细胞核在中央，直径约 6 μm。Jakobsen & Suhr-Jessen（1990）认为鲎（*Tachypleus tridentatus*）有两种类型的血细胞：颗粒细胞和胞质细胞，发现颗粒细胞大约占细胞总数的 97%；胞质细胞大约占血细胞总数的 3%。Van de Braak et al（1996）采用曙红对斑节对虾血细胞染色，根据染色后血细胞的不同表现，把斑节对虾血细胞分为 5 种类型：具有曙红色细胞浆的血细胞、无色到淡曙红色细胞浆的椭圆形细胞、无色到淡曙红色的圆形或卵圆形的血细胞、具有曙红色小球的血细胞、低核质比的血细胞。

最近，随着生物技术的发展，已经有报道用血细胞的膜蛋白制备单克隆抗体用于检测不同类型的血细胞。Sung et al(1999)利用斑节对虾高密度颗粒细胞的提取物制备的 4 种单克隆抗体，不仅可以用于研究斑节对虾的血细胞类型、行为和功能，也可以用来研究罗氏沼虾（*Microbrachrum rosenbergii*）、螯虾（*Procambarus clarkii*）和（*P. leniusculus*）的血细胞。Zhan et al（2001）也制备了中国明对虾血细胞的单克隆抗体，实验证明它能更准确地鉴定中国明对虾血细胞类型。Zhang et al（2004）采用单克隆抗体技术制备了 8 种凡纳滨对虾（*Litopenaeus vannamei*）血细胞的单克隆抗体，实验证明其中 5 种对中国明对虾和日本囊对虾（*Marsupenaeus japonicus*）呈阳性反应；2 种与三疣梭子蟹（*Portunes trituberculatus*）呈阳性反应。虽然单克隆抗体技术在血细胞类型的鉴定中表现更为灵敏，但是统一的标准尚需建立。

### 2.2　血细胞的细胞化学和功能

透明细胞和颗粒细胞不仅在形态学上不同，在细胞化学和功能上也有所差异。甲壳动物透明细胞的特点是：较高的核质比，细胞浆中存在丰富的体积小、圆形、电子致密的小体，在细胞溶解前积累台盼兰染料，主要参与血淋巴的凝集反应；颗粒细胞含有酚氧化酶和水解酶，主要参与细胞对外来异物的吞噬和包囊作用（Hose et al，1990）。

Hose et al（1987）采用特异性染料对溶酶体、细胞质内容物和颗粒进行酶染色的方法，对锐脊单肢虾的血细胞进行研究发现，采用苏丹黑 – B 染色后，无颗粒细胞（agranular hemocyte）和小颗粒细胞的一个亚群含有丰富的细胞质糖蛋白沉淀物，呈现出模糊和浓重的染色。十足目动物的一种凝集因子（coagulogen），从裂解的血细胞中释放出来时也被染色，其他类型的血细胞呈现轻微的染色。用酸性磷酸酶（acid phosphatase）、葡萄糖苷酸酶（glucuronidase）和非特异性的酯酶（non-specific esterase）染色后发现，在无颗粒细胞中没有溶酶体的存在，在苏丹黑染色的小颗粒细胞中也很少有溶酶体的存在；而大颗粒和无糖蛋白沉淀物的小颗粒细胞中存在大量的溶酶体。酸性磷酸酶存在于小颗粒细胞高尔基体的小囊泡中，大颗粒细胞很少呈现阳性反应，推测酸性磷酸酶在大颗粒细胞中是以无活性形式存在的。

Gargioni & Barracco（1998）对沼虾（*M. rosenbergii*）与（*M. acanthurus*）和圣保罗对虾（*Penaeus paulensis*）的血细胞进行研究后发现，这 3 种虾的血细胞中都包含透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞。两种沼虾的许多透明细胞中含有大量颗粒；而圣保罗对虾的透明细胞中几乎不含颗粒。除颗粒细胞外，它所有类型细胞的细胞浆中都含有丰富的碳水化合物（PAS 阳性），小囊泡中含有酸性磷酸酶（Gomori 氏染色反应）。这几种虾的小颗粒和大颗粒细胞均具有吞噬活性，在圣保罗对虾的血细胞中还观察到少量颗粒细胞的有丝分裂（低于 1%）；而在沼虾中没有观察到这种现象。小颗粒细胞是参与沼虾血细胞循环的主要类型；而在圣保罗对虾的血淋巴中透明细胞则占主导地位。

Martin et al（1999）对卤虫的血细胞染色后发现，它含有酸性磷酸酶，并能够与 L-DOPA 反应，表明其参与异物的裂解消化并存在酚氧化酶系统，在细胞黏附过程中需要 $Ca^{2+}$ 的激活，在修复受伤

机体的过程中血细胞结合在一起，能够吞噬细菌。鲎虫的血细胞类型和功能更类似于低等的螯角类（*Limulus polyphemus*）。Jakobsen & Suhr-Jessen（1990）发现颗粒细胞大约占鲎血细胞总数的97%，具有微管组成的边缘带，几乎没有游离的核糖体和线粒体，但是具有许多大的分泌颗粒，这些颗粒的内容物相同并且已经成熟。革兰氏阴性细菌内毒素刺激后，成熟颗粒高度组织化并产生分泌活动，未成熟的颗粒没有胞外分泌现象；无颗粒细胞大约占血细胞总数的3%，它们具有许多游离的核糖体和线粒体，但几乎没有任何分泌颗粒。细菌内毒素刺激后对无颗粒细胞没有影响。

关于不同类型血细胞功能的研究在20世纪90年代之前较多，一般认为，甲壳动物的大颗粒细胞具有酚氧化酶原系统，在受到免疫刺激后可以激活酚氧化酶原，以及具有细胞毒作用（Söderhäll et al，1985；Johansson & Söderhäll，1985；Vargas-Albores et al，2005）；小颗粒细胞也具有酚氧化酶原系统，具有细胞毒作用，并具有包囊作用和有限的吞噬作用（Johansson & Söderhäll，1985；Persson et al，1987b；Kobayashi et al，1990；Vargas-Albores et al，2005）。Vargas-Albores et al（2005）研究表明，对虾的酚氧化酶活性主要存在于大颗粒细胞中，约占75%，而小颗粒细胞中有小部分的酚氧化酶活性，约25%；透明细胞主要具有吞噬功能（Smith & Söderhäll，1983a；Söderhäll & Smith，1986；Thörnqvist et al，1994）。Dean et al（2004）在昆虫 *Manduca exta* 中发现了一种具有很强吞噬功能的血细胞，每个这类细胞可以吞噬大约五百个细菌；在参与血液循环的血淋巴中，这类血细胞的数量很少，大约仅占1%，而甲壳动物中还未见有类似报道。

## 3 血细胞在免疫反应中的作用

### 3.1 细胞数量在免疫反应中的变化

血细胞数量（total haemocyte counts，THC）变化与许多因子相关，并在一定程度上反应了对虾的健康状态。发育阶段、蜕皮周期、繁殖状况、营养条件、疾病和环境因子都对THC有影响（Cheng et al，2001）。

研究表明，THC低于正常水平时抵御病原的能力将大大降低（Silva et al，2000；Sung et al，2000；Le Moullac & Haffner，2000）。日本囊对虾和红额角对虾（*P. stylirostris*）分别被镰刀菌（*Fusarium solani*）和被溶藻胶弧菌（*Vibrio alginolyticus*）感染后，THC均显著下降（Yu，1993；Goarant & Boglio，2000）；斑节对虾感染鳗弧菌（*V. anguillarum*）后大量的血细胞聚集到感染部位并将入侵的细菌包围，血细胞和细菌在淋巴器官中积累并分解，导致异物入侵后，血淋巴中循环的THC下降（Van de Braak et al，2002a）。病毒对THC也有明显影响，人工注射感染Taura综合症病毒的凡纳滨对虾，其血细胞数量只有未注射组的21%（Song et al，2003）。斑节对虾感染WSSV后血细胞密度显著下降（Van de Braak et al，2002a）。Yao et al（2006，出版中）研究表明，在受到细菌刺激后中国明对虾参与循环的血细胞数量明显减少，但是其抗菌力明显增强。

对虾血细胞总数也会因为环境中污染物的存在而减少。Smith et al（1992）研究表明，环境中的有机污染物，如多氯联苯（PCBs）、多环芳香烃（PHA）会引起对虾的THC减少。作为环境中的另一种重要污染源——重金属也会引起对虾中血细胞数量的减少，研究表明，环境中的Hg、Cd、Cu、Cr、Zn及Pb会引起长臂虾（*Palaemon elegans*）循环中的血细胞数量减少，其中，Zn与Pb引起的对虾血细胞数量降低更为明显（Lorenzon et al，2001）。

Lee et al（2002）研究发现，每千克饲料中添加10—30 mg Cu饲养的斑节对虾，THC与对照组相比明显增加。他们还在饵料中添加维生素C的衍生物L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg（C2MP-Mg）和L-ascorbyl-2-polyphosphate（C2PP），对虾THC数量高于添加L-ascorbyl-2-monophosphate-Na（C2MP-Na）和L-ascorbyl-2-sulfate（C2S）组。这表明饵料中添加不同形式的维生素C对THC也有影响。

Zhou et al（2003）研究表明，在甲壳动物中，免疫增强剂具有活化血淋巴中的具吞噬能力的细胞，提高其吞噬病原的能力；刺激血淋巴中抗菌、溶菌活力提高；激活酚氧化酶原系统，产生识别信号及介导吞噬等作用。Söderhäll et al（2003）证明注射200 μL浓度为5 mg/mL海带多糖引起螯虾THC短暂下降后迅速回升；Persson et al（1987a）研究表明，注射β-1，3-glucan后对虾血细胞数量迅速增加，随后缓慢下降；与此相似，Van De Braak et al（2002a）研究表明，斑节对虾在注射100 μL 0.15% LPS后，血细胞数量也呈现类似变化。

Campa-Cordova et al（2002）将凡纳滨对虾仔虾在 β－葡聚糖和硫酸脂多糖溶液中浸浴后发现，血细胞数目先下降，24 h 后回升，48—120 h 一直高于对照组 THC 水平。本实验室研究发现，注射低浓度的昆布多糖可以引起对虾血细胞数量的增加，通过双向电泳与质谱深入研究表明，血细胞数量变化的同时血浆中的精氨酸激酶发生明显变化，进一步研究表明，血细胞中的转谷胺酰胺酶、精氨酸激酶等也发生明显变化。所有这些研究说明，免疫刺激剂会引起 THC 较为复杂的变化，其机理尚需进一步研究。

## 3.2　细胞免疫方式

细胞免疫主要包括吞噬作用、包囊作用和结节形成等。一般而言，血细胞通过吞噬作用清除进入血淋巴中的病原体。而当入侵的病原体或寄生虫的个体较大时则以多个血细胞的包囊作用或结节作用来完成。

3.2.1　吞噬作用　当外来病原体较小时，血细胞通过吞噬作用吞入病原体，在细胞内部将病原杀灭。吞噬作用的杀菌机制主要分为氧化性杀菌和非氧化性杀菌机制。

氧化性杀菌机制是指吞噬过程中伴有呼吸爆发现象出现，产生具有强大杀菌作用的活性氧（reactive oxygen species，ROS；reactive oxygen intermediates，ROIs）。主要过程是在与膜结合的 NADPH 氧化酶的催化下，磷酸已糖支路被激活，生成超氧阴离子（$O_2^{-\cdot}$），继而生成过氧化氢、羟自由基和单线态氧。这些活性氧有很强的杀菌功能，既可以直接杀灭微生物，也可以在过氧化物酶的作用下与卤化物作用生成杀菌效果很强的高卤化物（Roch，1999）；因此，活性氧产生的多少直接反应了血细胞杀菌机制的强弱。$O_2^{-\cdot}$ 与 NO 作用可产生 $ONOO^{-\cdot}$，$ONOO^{-\cdot}$ 可将胰蛋白酶硝基化生成硝基胰蛋白酶，$ONOO^{-\cdot}$ 是多巴合成的抑制剂，进而影响黑色素的生成（Homblad & Söderhäll，1999）。

尽管活性氧具有很强的杀菌效果，但活性氧的积累会对机体造成损害。生物体为避免活性氧的损害有两条途径，一是阻断活性氧的产生（介导这一过程的是离子贮存和运输蛋白，它们与离子结合能够阻断活性氧的产生）；另一条途径是利用体内的抗氧化酶清除活性氧，主要有超氧化物歧化酶（SOD）和过氧化氢酶（CAT）。呼吸爆发产生的多余的 $O_2^{-\cdot}$ 被胞质中的 SOD 催化生成 $H_2O_2$，它是一切需氧有机体清除 $O_2^{-\cdot}$，保护机体免受损害的关键酶。过氧化氢酶（CAT）催化 $H_2O_2$ 生成对机体无害的 $H_2O$ 与 $O_2$（Holmblad & Söderhäll，1999）。Yao et al（2004）已经分离得到日本沼虾（*Microbrachium nipponense*）体内的一种 SOD，这种 SOD 属于 Mn-SOD，但是其中某些性质与其他生物的 Mn-SOD 特性有一些差异。

非氧化杀菌机制主要以溶酶体酶和抗菌因子等为主。溶酶体存在于甲壳动物的大颗粒细胞和小颗粒细胞中，在吞噬过程中伴随着脱颗粒而释放，一旦进入血清中，溶酶体的膜裂解，其中的消化性和免疫性酶类，包括酸性磷酸酶、溶菌酶等被释放出来（Darnell et al，1986）。溶酶体的稳定与否已经成为许多动物健康状态的标志。Hauton et al（2001）和 Hauton et al（2004）研究发现，当甲壳动物处于不良环境中或者受到病原菌感染时，血细胞溶酶体的稳定性明显下降。对中国明对虾注射免疫多糖后，其血细胞内溶酶体稳定性明显增强，注射细菌后血细胞内溶酶体稳定性明显减弱，血细胞容易破碎，溶酶体容易崩解，释放出其中的溶菌酶可以直接杀灭外来病原菌。

溶菌酶具有明显的杀菌作用并且在甲壳动物体内广泛存在，由于其在非特异性免疫中具有重要作用而日渐受到研究者的重视。Stabili et al（1999）报道卤虫中存在一种蛋白具有溶菌酶和胰蛋白酶的活性，提示其在机体的非特异性免疫中可能起重要作用。Hikima et al（2003）从日本囊对虾血细胞 cDNA 文库中克隆得到了 1 056 bp 编码 C－型溶菌酶的 cDNA，由 156 个氨基酸残基组成，与凡纳滨对虾有 79.7% 的序列同一性。但与昆虫和其他无脊椎动物的序列相似性较低（33.3%—43.0%）。与其他脊椎动物或无脊椎动物 C－型溶菌酶相比，两个催化位点（Glu58 and Asp75）和 8 个半胱氨酸基元完全保守。进化分析表明，从日本囊对虾血细胞中克隆到的这个溶菌酶属于 C－型溶菌酶，用杆状病毒表达系统在昆虫细胞中对它进行体外表达后发现，重组的溶菌酶在 pH 7.5 和 50 ℃时具有最适活性，对弧菌具有裂解活性，暗示对虾的溶菌酶对许多病原可能都具有抵御能力。

Sotelo-Mundo et al（2003）克隆到凡纳滨对虾的溶菌酶，根据核苷酸序列推导出它编码 150 个氨基酸，属于 C－型溶菌酶，与鸡蛋清的 C－型溶菌酶具有 46% 的序列相似性。但是其 C 端包含额外

的氨基酸残基，具有海洋无脊椎动物的特点。作者也克隆到了中国明对虾 C－型溶菌酶基因（GenBank 登陆号：AY661543），分析结果显示得到的中国明对虾溶菌酶具有 C－型溶菌酶的典型特征，与其他甲壳动物溶菌酶表现出很高的相似性（Yao，2005）。对于对虾溶菌酶的分类目前也有不同报道，Bachali et al（2002）通过对多种动物溶菌酶进行分子进化分析后，认为对虾的溶菌酶属于无脊椎动物类的溶菌酶（I-type）。

另外，已经发现甲壳动物血细胞内存在多种类型的杀菌肽，这些杀菌肽的性质表现各异，大多数杀菌肽能杀灭多种类型的细菌，具有抗菌谱广的特点，其详细研究进展由 Bachèrè（2000）作过报道。

3.2.2 包囊作用 当侵入机体的异物颗粒较大（颗粒直径大于 10 μm）时则不能通过单个细胞的吞噬作用摄入体内，甲壳动物将启动多个细胞的防御反应把外来物以包囊作用围住并最终将其杀死。多个细胞围绕异物颗粒聚集成团，形成多层细胞重叠组成的包囊。随之发生黑化作用，将外来物隔离开或修复很大的伤口。尽管在包囊形成的快慢、包囊是否发生黑化作用及参加包囊的血细胞的类型方面存在一定的差异，但包囊的形态在各个物种之间是十分类似的（Lackie，1988；Strand & Pech，1995）。Deng et al（1999）用鳗弧菌注射中国明对虾，对其体内血细胞的包囊作用进行超微结构和组织化学观察结果表明，包囊产生于多种器官和组织，形成包囊作用的血细胞失去游离状态并相互连接，在包囊中检测到了黑色素的产生，而黑色素对真菌和寄生虫等均有杀灭作用。

包囊作用是一个比较复杂的过程，其中需要多种免疫因子的参与。研究发现，血淋巴中的凝集素可以促进罗氏沼虾血细胞的凝集能力（Sierra et al，2005）；促进烟草天蛾（*Manduca sexta*）幼虫血细胞包囊作用的发生（Yu & Kanos，2004）。烟草天蛾血细胞的凝集作用还需要整联蛋白的参与（Levin et al，2005）。在蚊子（*Armigeres subalbatus*）体内，血细胞的包囊与黑化作用需要β-1，3－葡聚糖识别蛋白（GRP）的参与（Wang et al，2005）。甲虫（*Tenebrio molitor*）幼虫体内与滞育蛋白－1同源性很高的 86 kDa 蛋白与昆虫的血细胞的包囊作用有关（Cho et al，1999）。昆虫 *Galleria mellonella* 幼虫的血细胞内存在一种与人及果蝇钙网蛋白同源性很高的 47 kDa 蛋白，这种蛋白含量的增加可能是包囊作用发生的早期信号（Choi et al，2002）。但是，关于甲壳动物血细胞的包囊作用发生的详细机制还不清楚。

3.2.3 结节形成 结节是将黏性的细胞外入侵物截留的血细胞聚集体，这些聚集体通常是在酚氧化酶的作用下发生黑化反应。很多研究表明，当把外来物注射到无脊椎动物的体内时，循环血细胞的数目显著下降（Smith & Söderhäll，1983a，b；Martin et al，1993），而且血细胞随后发生凝集反应将鳃丝的维管结构阻塞（Smith & Ratcliffe，1980）。甲壳类动物的血细胞除了含有能够激活免疫反应的酚氧化酶外，还含有细胞粘附蛋白（Johansson & Söderhäll，1989），能够将细胞和外来物结合形成紧密凝集状的结节。Martin et al（1998）发现从龙虾和对虾中抽取的血淋巴与培养基混合后，无论有没有细菌存在，血细胞都会迅速地聚集成结节。随着结节的变大，游离的血细胞、结节和细菌（如果存在）的数目都会随之减少。加入多肽 RGD（arg-gly-asp）可以抑制结节形成。Miller et al（1996）研究表明，在无脊椎动物甲虫（*Zophobas atratus*）体内，凝血烷酸激素促进了结节的形成，如果抑制凝血烷酸激素的合成，结节的形成将大大减少。不同类型血细胞的作用见表 1。

**表 1 甲壳动物血细胞的类型、功能及在免疫防御中的作用**

**Tab. 1 Classification，function and action mode of crustacean haemocytes in immune response**

| 类型<br>Haemocyte type | 在免疫反应中的功能<br>Haemocyte Function in immunity | 在免疫反应中的作用方式<br>Action mode of haemocytes in immune response |
|---|---|---|
| 透明细胞 | 吞噬 | 氧化性杀菌 |
| 小颗粒细胞 | 包囊，有限的吞噬，贮存和释放酚氧化酶原系统，细胞毒性 | 形成包囊；酚氧化酶系统激活后的级联反应，黑化作用，非氧化性杀菌 |
| 大颗粒细胞 | 贮存和释放酚氧化酶原系统，细胞毒性 | 形成包囊、结节；酚氧化酶系统激活后的级联反应，非氧化性杀菌 |

作为甲壳动物免疫系统的最重要组成部分之一，血细胞已经成为当今研究的焦点和热点。随着生物实验技术的不断发展，甲壳动物血细胞的研究也随之深入，从过去的形态学分析到细胞组织化学、单克隆抗体技术的应用，从细胞水平的研究到在基因组及蛋白质组水平上对其中的免疫因子进行分析，随之不断深入；但是与其他无脊椎动物相比，甲壳动物的血细胞免疫机理的研究还相对滞后。免疫反应是一个交互作用的复杂过程，其中必然涉及多个因子的参与，对这些免疫因子的功能及它们之间相互作用方式的研究，对于深入了解甲壳动物的免疫作用机理具有重要意义。

**参考文献：**


Alikhan MA，Naich M. 1987. Changes in counts of haemocytes and in their physiological properties during the molt cycle in *Porcellio laevis Latreille*（Poorcellionilae，Isopoda）[J]. *Can J Zool*，**65**：1685－1688.

Bachali S，Jager M，Hassanin A，Schoentgen F，Jolle's P，Fiala-Medioni A，Deutsch JS. 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function [J]. *J Mol Evol*，**54**：652－664.

Bachèrè E，Destoumieux D，Bulet P. 2000. Penaeidins，antimicrobial peptides of shrimp：A comparison with other effectors of innate immunity [J]. *Aquaculture*，**191**：71－88.

Barracco MA，Ameirante GA. 1992. Morphological and cytochemical studies of hemocytes of *Squilla mantis* [J]. *J Crust Biol*，**12**：372－382.

Benjamin LR，James BL. 1987. Light and electron microscopy of the hemocytes of *Ligia oceanica*（L.）（Crustacea：Isopoda）[J]. *J Inver Pathol*，**49**：19－25.

Campa-Cordova AI，Hernaundez-Saavedra NY，De Philippis R，Ascencio F. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp（*Litopenaeus vannamei*）as a response to β-glucan and sulphated polysaccharide [J]. *Fish Shellfish Immunol*，**12**：353－366.

Chaga O，Lignell M，Söderhäll K. 1995. The haemopoietic cells of the freshwater crayfish，*Pacifastacus leniusculus* [J]. *Anim Biol*，**4**：59－70.

Cheng WT，Chen JC. 2001. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn，*Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish Shellfish Immunol*，**11**：53－63.

Cho MY，Choi HW，Moon GY，Kim MH，Kwon TH，Homma K，Natori S，Lee BL. 1999. An 86 kDa diapause protein 1-like protein is a component of early-staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect，*Tenebrio molitor larvae* [J]. *FEBS Lett*，**451**：303－307.

Choi JY，Whitten MMA，Cho MY，Lee KY，Kim MS，Ratcliffe NA，Lee BL. 2002. Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae [J]. *Devel Comp Immunol*，**26**：335－343.

Darnell JE，Lodish，HF，Baltimore D. 1986. Molecular Cell Biology [M]. New York and Oxford：Scientific American Books，Inc，1192.

Dean P，Potter U，Richards EH，Edwards JP，Charnley AK，Reynolds SE. 2004. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta* [J]. *J Insect Physiol*，**50**：1027－1036.

Deng H，Chen Q，Liu WD，An YX. 1999. Ultrastructural and histochemical observation on capsulation of hemocytes in Chinese shrimp *Penaeus chinensis* [J]. *Chn Appl Environ Biol*，**5**（3）：296－299.［邓　欢，陈　俅，刘卫东，安育新. 1999. 中国对虾血细胞包掩作用的超微结构和组织化学观察. 应用与环境生物学报，**5**（3）：296－299.］

Gargioni R，Barracco MA. 1998. Hemocytes of palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*，and of the *Penaeus paulensis* [J]. *J Morphol*，**236**：209－221.

Ghiretti-Magaldi A，Milanese C，Tognon G. 1977. Hemotopoiesis in crustaceans decapoda：Origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenus* [J]. *Cell Differ*，**6**：167－186.

Goarant C，Boglio E. 2000. Changes in hemocyte counts in *Litopenaeus stylirostris* subjected to sublethal infection and to vaccination [J]. *J World Aquacul Soc*，**31**：123－129.

Hauton C，Hawkins LE，Hutchson S. 2001. Response of haemocyte lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis*（L）. and *Crassostrea gigas*（Thunberg）and the scallop *Pecten maximus*（L.）[J]. *Fish Shellfish Immunol*，**11**：143－153.

Hauton C，Smith VJ. 2004. *In vitro* cytotoxicity of crustacean immunostimulants for lobster（*Homarus gammarus*）granulocytes demonstrated using the neutral red uptake assay [J]. *Fish Shellfish Immunol*，**17**：65－73.

Hernroth B，Baden SP，Holm K，André T，Söderhäll I. 2004. Manganese induced immune suppression of the lobster，*Nephrops norvegicus* [J]. *Aquat Toxicol*，**70**（3）：223－231.

Hikima S，Hikima J，Rojtinnakorn J，Hirono I，Aoki T. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. *Gene*，**316**：187－195.

Holmblad T，Söderhäll K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean，possible role in immunity [J]. *Aquaculture*，**172**：111－123.

Hose IE，Martin GG，Gerard AS. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology，cytochemistry，and function [J]. *Biol Bull*，**178**：33－45.

Hose JE，Martin GG，Nguyen VA，Lucas J，Rosenstein VA. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes [J]. *Biol Bull*，**173**：178－187.

Hose JE，Martin GG，Tiu S，McKrell N. 1992. Patterns of hemocyte production and release throughout the moult cycle in the penaeid shrimp *Sycionia ingentis* [J]. *Biol Bull*，**183**：185－189.

Jakobsen PP，Suhr-Jessen P. 1990. The horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* has two kinds of hemocytes：Granulocytes and plasmatocytes [J]. *Biol Bull*，**178**：55－64.

Jiravanichpaisal P，Sricharoen S，Söderhäll I，Söderhäll K. 2006. White spot syndrome virus（WSSV）interaction with crayfish haemocytes [J]. *Fish & Shellfish Immunol*，**20**（5）：718－727.

Johansson MW，Söderhäll K. 1985. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system [J]. *Parasitol Today*，**5**：171－176.

Johansson MW，Söderhäll K. 1989. A cell adhension factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells [J]. *Insect Biochem*，**19**：183－190.

Kobayashi M，Johansson MW，Söderhäll K. 1990. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation *in vitro* [J]. *Cell Tissue Res*，**260**：13－18.

Lackie AM. 1988. Immune mechanisms in insects [J]. *Parasitol Today*，**4**：98－105.

Le Moullac G, Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune response in crustacea [J]. *Aquaculture*, **191**: 121 – 131.

Lee MH, Shiau SY. 2002. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **12**: 119 – 129.

Levin DM, Breuer LN, Zhuang S, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR. 2005. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, **35**: 369 – 380.

Liu RY. 2003. The introduction of the newest classification of modern Crustacea [A]. In: Transactions of the Chinese Crustacean Society. 4 [M]. Beijing: Science Press, 78 – 88. [刘瑞玉. 2003.《现生甲壳动物亚门(CRUSTACEA)最新分类系统》简介,甲壳动物论文集,第四辑. 北京:科学出版社,78 – 88.]

Lorenzon S, Francese M, Smith VJ, Ferrero EA. 2001. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **11**: 459 – 472.

Lu HD. 2002. Classification and morphological observations of haemocytes in *Eriocheir sinensis* by electron microscopies [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, **26**: 7 – 15. [陆宏达. 2002. 中华绒螯蟹血细胞的显微、亚显微形态结构及其分类. 水生生物学报, **26**: 7 – 15.]

Martin GG, Hose JE, Choi M, Provost R, Omori G, McKrell N, Lam G. 1993. Organization of hematopoietic tissue in the intermoult lobster *Homarus americanus* [J]. *J Morphol*, **216**: 65 – 78.

Martin GG, Kay J, Poole D, Poole C. 1998. *In vitro* nodule formation in the ridgeback prawn, *Sycionia ingentis*, and the American lobster, *Homarus americanus* [J]. *Inver Biol*, **117**: 155 – 168.

Martin GG, Lin HMJ, Luc C. 1999. Reexamination of hemocytes in brine shrimp (Crustacea, *Branchiopada*) [J]. *J Morphol*, **242**: 283 – 294.

Mats WJ, Pia K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, **191**: 45 – 52.

Miller JS, Howard RW, Nguyen T, Nguyen A, Rosario RMT, Stanley-Samuelson DW. 1996. Mediators of insect immunity: Eicosanoids mediate nodulation responses to bacterial infections in larvae of the tenebrionid beetle, *Zophobas atratus* [J]. *J Insect Physiol*, **42**: 3 – 12.

Persson M, Cerenius L, Söderhäll K. 1987a. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* [J]. *J Fish Dis*, **10**: 471 – 477.

Persson M, Vey A, Söderhäll K. 1987b. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus* [J]. *Cell Tissue Res*, **247**: 409 – 415.

Ravindranath MH. 1974. The hemocytes of an isopod *Ligia exotica* Roux [J]. *J Morphol*, **144**: 11 – 22.

Roch P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates [J]. *Aquaculture*, **172**: 125 – 145.

Sierra C, Lascurain R, Pereyra A, Guevara J, Martínez G, Agundis C, Zenteno E, Vázquez L. 2005. Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes [J]. *Dev Comp Immunol*, **29**: 113 – 121.

Silva PIJr, Daffres S, Bulet P. 2000. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family [J]. *J Biol Chem*, **275**: 33464 – 33470.

Smith VJ, Johnston PA. 1992. Differential haemotoxic effect of PCB congeners in the common shrimp, *Crangon crangon* [J]. *Comp Biochem Physiol C*, **101**: 641 – 649.

Smith VJ, Ratcliffe NA. 1980. Host defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.): Clearance and distribution of infected test particles [J]. *J Mar Biol*, **60**: 89 – 102.

Smith VJ, Söderhäll K. 1983a. β-1, 3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Bull*, **164**: 299 – 314.

Smith VJ, Söderhäll K. 1983b. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro* [J]. *Cell Tissue Res*, **233**: 295 – 303.

Söderhäll K, Cerenius L. 1992. Crustacean immunity [J]. *Annu Rev, Fish Dis*, **2**: 3 – 23.

Söderhäll K, Smith VJ. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition and defense system in arthropods [A]. In: Gupta AP. Humoral and Cellular Immunity in Arthropods [M]. New York: Wiley, 251 – 285.

Söderhäll K, Wingren A, Johansson MW, Bertheussen K. 1985. The cytotoxic reaction of hemocytes from the freshwater crayfish, *Astacus astacus* [J]. *Cell Immunol*, **94**: 326 – 332.

Söderhäll I, Bangyeekhun E, Mayo S, Söderhäll K. 2003. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal: Proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Devel Comp Immunol*, **27**: 661 – 672.

Song YL, Yu C, Lien TW, Huang CC, Lin MN. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with *Taura syndrom* virus [J]. *Fish Shellfish Immunology*, **14**: 317 – 331.

Sotelo-Mundo RR, Islas-Osuna MA, de-la-Re-Vega E, Hernández-López J, Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **15**: 325 – 331.

Stabili L, Miglietta AM, Belmonte G. 1999. Lysozyme-like and trypsin-like activities in the cysts of *Artemia fransciscana* (Kellog, 1906). Is there a passive immunity in a resting stage [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, **237**: 291 – 303.

Strand MR, Pech LL. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships [J]. *Annu Rev Entomol*, **40**: 31 – 56.

Sung HH, Wu PI, Song YL. 1999. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): Immunochemical differentiation of three major haemocyte types [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **9**: 167 – 179.

Sung HH, Hwang SF, Tasi FM. 2000. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp [J]. *J Inver Pathol*, **76**: 278 – 284.

Thörnqvist PO, Johansson MW, Söderhäll K. 1994. Opsonic activity of cell adhesion protein and β-1, 3-glucan binding protein from two crustaceans [J]. *Dev Comp Immunol*, **18**: 3 – 12.

Van de Braak CBT, Fober R, Boon JH. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) haemolyph [J]. *Comp Haematol Int*, **6**: 194 – 203.

Van De Braak CBT, Botterblom MHA, Huisman EA. 2002a. Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrom virus infection in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Dis Aquat Org*, **51**: 149 – 155.

Van de Braak CBT, Botterblom MHA, Liu W. 2002b. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, **12**: 253 – 272.

Vargas-Albores F, Gollas-Galván T, Hernández-López J. 2005. Functional characterization of *Farfantepenaeus californiensis*, *Litopenaeus vannamei* and *L. stylirostris* haemocyte separated using density gradient centrifugation [J]. *Aquacul Res*, **36**: 352 – 358.

Vogt G, Quinitio ET. 1994. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium [J]. *Aquatic Toxicol*, **28**: 223 – 241.

Wang X, Fuchs JF, Infanger L, Rocheleau TA, Hillyer JF, Chen C, Christensen BM. 2005. Mosquito innate immunity: Involvement of β-1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune responses in *Armigeres subalbatus* [J]. *Mol*

*Biochem Parasitol*，**139**：65 – 73.

Yao CL，Wu CG，Xiang JH. 2006. Selection of antimicrobial methods and changes of antimicrobial activity of plasma and haemocytes in Chinese shrimp，*Fenneropenaeus chinensis* after bacteria challenge［J］.（in Press）*Oceanol Limnol Sin*，**37**（6）.［姚翠鸾，吴长功，相建海. 2006. 灭活鳗弧菌攻毒后中国明对虾血淋巴抗菌力变化. 海洋与湖沼，**37**（6）. 出版中.］

Yao CL. 2005. Changes of antibacterial activity in blood of *Fenneropenaeus chinensis* after immunostimulation and study on lysozyme and arginine kinase［D］. Ph. D. thesis，Institute of Oceanology，Chinese Academy of Sciences，Qingdao.［姚翠鸾. 2005. 免疫刺激后中国明对虾血液抗菌力变化及免疫因子溶菌酶和精氨酸激酶的研究. 中国科学院海洋研究所博士学位论文.］

Yao CL，Wang AL，Wang WN，Sun RY. 2004. Purification and partial characterization of Mn superoxide dismutase from muscle tissue of the shrimp，*Macrobrachium nipponense*［J］. *Aquaculture*，**241**：621 – 631.

Yao CL，Wu CG，Xiang JH，Dong B. 2005. Molecular cloning and response to laminarin stimulation of arginine kinase in haemolymph in chinese shrimp，*Fenneropenaeus chinensis*［J］. *Fish Shellfish Immunology*，**19**（4）：317 – 329.

Yu JP. 1993. The classification，density and compose of shrimp，*Penaeus japonicus*，haemocytes［J］. *J Ocean Univ Qingdao*，**23**（1）：107 – 113.［于建平. 1993. 日本对虾血细胞分类、密度及组成. 青岛海洋大学学报，**23**（1）：107 – 113.］

Yu XQ，Kanost MR. 2004. Immulectin-2，a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm，*Manduca sexta*［J］. *Devel Comp Immunol*，**28**：891 – 900.

Zhan WB，Wang S，Zhang LF，Zhang ZD. 2002. Studies on distribution of hamatopietic tissue in the postlarva（*Penaeus chinensis*）［J］. *Acta Hydrobiol Sin*，**26**（5）：574 – 576.［战文斌，王　姝，张利峰，张志栋. 2002. 中国对虾仔虾造血组织分布的研究. 水生生物学报，**26**（5）：574 – 576.］

Zhan WB，Zhang LF，Zhang ZD，Zhou L，Song WB. 2001. Production of monoclonal antibodies against hemocyte of shrimp（*Penaeus chinensis*）and using them to analysis the hemocyte types［J］. *High Technol Lett*，**11**（6）：19 – 22.［战文斌，张利峰，张志栋，周丽，宋微波. 2001. 中国对虾血细胞单克隆抗体研制及对虾血细胞类型的鉴别. 高技术通讯，**11**（6）：19 – 22.］

Zhang Z，Zhan W，Xue Y，Xing J. 2004. Antigenic cross-reactivity of crustacean haemocytes using monoclonal antibodies produced against haemocytes of shrimp（*Litopenaeus vannamei*）［J］. *Fish Shellfish Immunol*，**16**：71 – 73.

Zhou J，Huang J，Song XL. 2003. Applications of immunostimulants in aquaculture［J］. *Mar Fishe Res*，**24**（4）：70 – 79.［周　进，黄倢，宋晓玲. 2003. 免疫增强剂在水产养殖中的应用. 海洋水产研究，**24**（4）：70 – 79.］

Zhou Y，Mu ZK，Yang ZG. 2001. Haemocyte morphology，classification and differential count of swimming crab，*Portunes trituberculatus*［J］. *J Shanghai Fish Univ*，**10**（3）：279 – 281.［周　玉，穆占昆，杨振国. 2001. 三疣梭子蟹血淋巴的形态、分类及计数. 上海水产大学学报，**10**（3）：279 – 281.］

Zhu NN，Wang W，Gu ZF，Li ZR. 2002. Ultrastructural study on hemocyte of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*［J］. *J Fish Sci Chn*，**9**（2）：114 – 116.［朱宁宁，王　文，顾志峰，李正荣. 2002. 中华绒螯蟹血淋巴细胞的超微结构. 中国水产科学，**9**（2）：114 – 116.］